



PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
KLEBL, et al.

Examiner: Not Yet Known

Group Art Unit.: Not Yet Known

Application No.: **10/736,801**

Filed: **December 16, 2003**

Title: **METHOD FOR GENERATING A
GENETICALLY MODIFIED
ORGANISM**

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Date of Deposit January 13, 2004

James Pierre, Sr.

(Type or print name of person mailing paper)

(Signature of person mailing paper)

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)

Applicants submit herewith certified copies of German application, 102 58 885.6, filed on December 17, 2002, for which priority is claimed in the above-identified application.

This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

F. Aaron Dubberley

F. Aaron Dubberley, Reg. No. 41,001
Attorney/Agent for Applicant

Aventis Pharmaceuticals Inc.
Patent Department
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, New Jersey 08807-0800
Telephone (908) 231-3737
Telefax (908) 231-2626

Aventis Docket No. DEAV2002/0089 US NP

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 58 885.6

Anmeldetag: 17. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Generierung eines gentechnisch ver-
änderten Organismus

IPC: C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Letang', is written over a printed name.

Letang

Verfahren zur Generierung eines gentechnisch veränderten Organismus

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Generierung eines nicht menschlichen, gentechnisch veränderten Organismus für das Wirksubstanzscreening, sowie Assays basierend auf derartigen Organismen.

Es ist bekannt, zum Wirksubstanzscreening, gentechnisch veränderte Hefen einzusetzen, die das Zielprotein, welches durch die zu testende Substanz inhibiert werden soll, heterolog exprimieren. Heterologe Expression bedeutet im Rahmen dieser Erfindung die Expression eines dem Organismus fremden Gens oder die Expression eines dem Organismus eigenen Gens mit verändertem

Expressionsmuster, insbesondere verstärkter oder verminderter Expression, und/oder zeitlich und/oder räumlich (z.B. andere Kompartimente, bei höheren

Organismen z.B. andere Gewebe) veränderter Expression. Im einfachsten Fall führt die heterologe Expression zu einem detektierbaren, veränderten Phänotyp, meist einer Wachstumsinhibierung der Hefe. Wachstumsinhibierung bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine verminderte Proliferationsrate und/oder ein vermindertes Größenwachstum und schließt auch den Zelltod (apoptotisch oder nekrotisch) ein. Die Art der auftretenden Wachstumsinhibierung hängt auch vom Organismus ab, so ist bei Hefen eher ein Proliferationsarrest oder eine Lyse zu beobachten, bei eukaryontischen Zellen, die ursprünglich aus Vielzellern stammen, ist dagegen z.T. auch Apoptose zu beobachten. Führt die heterologe Expression zu einer von aussen wahrnehmbaren Veränderung von Verhalten und/oder

Morphologie des Organismus (also einem veränderten Phänotyp), so kann der gentechnisch veränderte Organismus einfach für das Wirksubstanzscreening eingesetzt werden, wobei die Wirksamkeit der getesteten Substanzen anhand ihrer Fähigkeit, den Phänotyp (z.B. die Wachstumsinhibierung) aufzuheben oder zu vermindern, feststellbar ist. Dies erfolgt beim Beispiel Hefesystem mit Wachstumsinhibierung als verändertem Phänotyp vorzugsweise durch einfache Wachstumsassays, die sich auch für das Hochdurchsatz-Screening (HTS) eignen.

Als veränderter Phänotyp wird jede von aussen wahrnehmbare Veränderung des

gentechnisch veränderten Organismus (Gestalt, Größe, etc.) oder seines Verhaltens (Wachstum, Zellteilungsrate, etc.) gegenüber dem des gentechnisch nicht veränderten bzw. Dem das oder die heterologen Proteine oder -Fragmente nicht exprimierenden Organismus bezeichnet. Phänotypisierung bezeichnet somit die Herbeiführung einer solchen Veränderung.

Dieses Verfahren des Standes der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass nur ein geringer Teil heterolog exprimierter Gene einen für das Wirksubstanzscreening nutzbaren Phänotyp des gentechnisch veränderten Organismus hervorbringt. So wird vermutet, daß beispielsweise nur ca. 20-30% aller heterolog exprimierten Kinasen eine für das Wirksubstanzscreening nutzbare Wachstumsinhibierung in der Hefe verursachen. Bei den übrigen 70-80% ist die Wachstumsinhibierung so gering, dass sie für das Screening nicht nutzbar ist (zu geringer Unterschied im Vergleich zur Kontrolle führt zu einem hohen Hintergrund und somit zu einer zu hohen Zahl an falsch Positiven), oder sie ist gar nicht vorhanden.

Es besteht daher Bedarf an einem Verfahren zur Generierung eines gentechnischen Organismus für das Wirksubstanzscreening, welcher die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist und insbesondere dafür geeignet ist, auch solche heterolog exprimierten Gene dem Wirksubstanzscreening zuzuführen, welche in dem sie heterolog exprimierenden Organismus keinen bzw. keinen für das Screening, insbesondere das HTS, nutzbaren Phänotyp hervorbringen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Generierung eines gentechnisch veränderten Organismus für das Wirksubstanzscreening mit den Schritten

a) Herbeiführung der heterologen Expression mindestens eines Proteins oder Proteinfragmentes durch gentechnische Veränderung des Organismus.

b) Vorzugsweise schließt sich hieran die Bestimmung des Phänotyps des gentechnisch veränderten Organismus an.

- c) Analyse des veränderten Genexpressionsmusters und Identifizierung kompensatorisch differentiell regulierter Gene.
- d) Phänotypisierung des Organismus (vorzugsweise durch Deletion, Mutagenese, oder Überexpression der kompensatorisch regulierten Gene zur Verstärkung oder Generierung eines Phänotyps in Kombination mit dem heterolog exprimierten Protein oder Proteinfragment).

5

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis der Erfinder, dass das Fehlen eines detektierbaren Phänotyps bei heterologer Expression der meisten Gene darauf beruht, dass der gentechnisch veränderte Organismus die Expression eigener Gene als Antwort auf die Expression des heterolog exprimierten Proteins oder Proteinfragmentes hoch- oder herunterreguliert (d.h. kompensatorisch differentiell reguliert). Differentiell reguliert bedeutet in diesem Fall, anders reguliert als im nicht gentechnisch veränderten Organismus, bzw. ohne die heterologe Expression des heterolog exprimierten Proteins oder Proteinfragmentes. Kompensatorisch bedeutet, dass diese Differentielle Genregulation eine Antwort auf die heterologe Expression des Proteins oder Proteinfragmentes ist.

15

Die Erfindung ermöglicht die Entwicklung einer Plattformtechnologie in einem zellulären, im Gegensatz zum einfach biochemischen, Modell, vorzugsweise der Hefe. Mit dem Assaysystem können Inhibitoren beispielsweise aus chemischen Bibliotheken, aus Combichembibliotheken und aus Naturstoffextrakten identifiziert werden. Das Assaysystem kann auf 96-, 384- oder 1536-well Platten oder andere für zelluläre Assays gängige Formate angepasst werden. Das zu wählende Format hängt z.T. auch vom gewählten Organismus ab, die Auswahl liegt dabei im Bereich des fachmännischen Könnens.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für Gene bzw. Proteine oder -Fragmente, deren heterologe Expression im gewünschten Organismus zu keiner detektierbaren Veränderung des Phänotyps gegenüber dem der gentechnisch unveränderten, bzw. das Protein oder -Fragment nicht heterolog exprimierenden Organismus führt. Es können beispielsweise Proteinkinasen ebenso wie andere

30

Genprodukte getestet werden, die eine transkriptionelle Antwort auslösen. Es ist jedoch ebenso bei detektierbar veränderten Phänotyp anwendbar, insbesondere dann, wenn zwar ein veränderter Phänotyp detektierbar ist, aber aus bestimmten Gründen für den Einsatz im Wirksubstanzscreening nicht geeignet oder nicht zweckmäßig ist. Dieser kann durch die Phänotypisierung verstärkt oder so verändert werden, dass er für das Wirkstoff-Screening nutzbar ist. Die Phänotypisierung bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung demnach die Herbeiführung oder Verstärkung eines vom das oder die Proteine oder -Fragmente nicht heterolog exprimierenden bzw. vom nicht gentechnisch veränderten Organismus unterscheidbaren Phänotyps im das oder die Proteine oder -Fragmente heterolog exprimierenden, gentechnisch veränderten Organismus.

10

Als Organismen eignen sich vorzugsweise Zellen, hier eukaryontische Zellen ebenso wie prokaryontische, aber auch vielzellige nicht-humane Organismen, die sich für das Wirksubstanzscreening eignen, z.B. *Drosophila* und vorzugsweise *C. Elegans*. Als eukaryontische Zellen eignen sich vorzugsweise kultivierte Zelllinien, die ursprünglich aus vielzelligen Organismen gewonnen wurden, z.B. 3T3, CHO, HeLa, aber auch andere oder eukaryontische einzellige Organismen, insbesondere Hefen. Unter den Hefen eignen sich wiederum insbesondere solche der Stämme *S. cerevisiae* oder *S. pombe*. Dem Fachmann sind geeignete Laborstämme von Hefezellen oder geeignete eukaryontische Zelllinien hinlänglich bekannt.

20

Als Proteine und Proteinfragmente kommen grundsätzlich alle die in Frage, deren heterologe Expression im Organismus zu einer Veränderung des Expressionsmusters eigener Gene führt. Vorteilhaft sind alle Proteine und -fragmente, die für die Findung neuer Wirkstoffe von Interesse sind, im Rahmen dieser Erfindung sind besonders bevorzugt Kinasen, Phosphatasen, GPCRs, (insbesondere kleine) GTPasen, Proteasen und Ionenkanäle.

25

Der Begriff Wirksubstanzscreening umfasst im Rahmen dieser Erfindung jede Art der Suche von Substanzen, die sich auf die Aktivität eines oder mehrerer bestimmter Zielgene und/oder Zielproteine auswirken, unter Einsatz mindestens eines gentechnisch veränderten Organismus. Es kommen dabei grundsätzlich alle Arten von Substanzen in Frage, beispielsweise alle Arten von Naturstoffen (also in der

30

Natur vorkommende Moleküle, insbesondere Biomoleküle) ebenso wie nicht natürlich vorkommende, synthetisch hergestellte Chemikalien und von Naturstoffen, insbesondere biologischen Molekülen abgeleitete Substanzen/ Derivate (z.B. modifizierte Peptide oder Oligonukleotide).

5 Die heterologe Expression kann die Einschleusung eines fremden Gens aber auch die veränderte Expression eines Organismus-eigenen Gens, z.B. durch die Einschleusung eines entsprechenden Expressionsvektors umfassen. Die dazu notwendige, gentechnische Veränderung kann dabei die Veränderung des Organismengenoms (z.B. durch stabile, ins Genom integrierende Vektoren oder durch verschiedene Arten der Mutagenese) betreffen, episomal sein oder einfach die Einschleusung geeigneter Vektoren umfassen, die zum Verbleib im Organismus der ständigen Selektion mittels eines oder mehrerer Selektionsmarker bedürfen. Die bestgeeignete Art hängt von verschiedenen Faktoren, u.a. auch von der Art des Organismus ab und ist für den zuständigen Fachmann einfach bestimmbar.

15 Die heterologe Expression betrifft dabei mindestens ein Protein oder -fragment, kann aber auch mehrere Proteine oder -fragmente betreffen. Es kann zweckmäßig sein, die Expression des heterologen Proteins/Fragments durch geeignete Methoden (PCR, Northern-, Westernblot etc.) zu verifizieren, bevor das Genexpressionsmuster des gentechnisch veränderten Organismus mit dem ohne die Expression des

20 heterologen Proteins verglichen und so analysiert wird. Die Analyse erfolgt durch geeignete Massnahmen, die dem Fachmann hinlänglich bekannt sind, insbesondere eignet sich dazu der Einsatz von von Array- (vzw. DNA/RNA oder Protein Microarrays) oder Chip Systemen. Durch Vergleich der Expressionsmuster eines

25 Kontroll Organismus (z.B. eines Wildtyp Organismus oder eines Organismus, in den lediglich der Leervektor eingeschleust wurde oder bei induzierbaren Systemen der gentechnisch veränderte Organismus, bei dem die Expression des heterologen Gens nicht induziert ist) und des gentechnisch veränderten, das heterologe Gen exprimierenden Organismus. Solche Genprodukte, die im Expressionsmuster des gentechnisch veränderten, das heterologe Gen exprimierenden Organismus im

30 Gegensatz zu dem Expressionsmuster des Kontrollorganismus überhaupt / verstärkt/ vermindert oder gar nicht auftauchen, werden somit als kompensatorisch

differentiell regulierte Gene erachtet und können für die Phänotypisierung des gentechnisch veränderten Organismus eingesetzt werden.

Die Phänotypisierung bezeichnet die Herbeiführung oder Verstärkung eines vom Wildtyporganismus unterscheidbaren Phänotyps im gentechnisch veränderten Organismus (oder, bei induzierbaren Systemen, eines Phänotyps, der nur bei heterologer Expression des oder der Proteine oder -Fragmente durch den

5 gentechnisch veränderten Organismus ausgebildet wird und im nicht-induziertem Zustand des Organismus, wenn das oder die Proteine oder -Fragmente nicht exprimiert werden, nicht ausgebildet ist), vorzugsweise handelt es sich dabei um einen für die Auswertung in HTS Wirksubstanzscreeninggeeigneten Phänotyp. Die

10 Herbeiführung oder Verstärkung kann dabei beispielsweise auf der Minderung oder Aufhebung der Expression eines oder mehrerer kompensatorisch hochregulierter Gene (dies kann z.B. durch genomischen Knock Out einer oder mehrerer der kompensatorisch differentiell regulierten Gene oder durch Mutagenese erfolgen)

15 oder der verstärkten Expression eines oder mehrerer kompensatorisch herunterregulierter Gene erfolgen. (Dies kann z.B. durch heterologe Expression einer oder mehrerer kompensatorisch differentiell herunterregulierter Gene mit geeigneten Expressionsvektoren erfolgen.) Auf diese Weise kann ein dem Organismus- eigener, durch das heterolog exprimierte Gen herbeigeführter

20 Phänotyp, der durch die kompensatorisch differentielle Regulation eines oder mehrerer Gene unterbunden wurde, zu Tage gebracht werden (vorzugsweise die Wachstumshemmung, insbesondere bei vielzelligen Organismen kommen hier aber auch andere Phänotypen in Frage).

25 Eine weitere Möglichkeit ist auch die Markierung eines oder mehrerer Gene, die kompensatorisch hochreguliert sind, mittels eines geeigneten Markers / Tags (der z.B. an das Genprodukt gekoppelt ist) oder mittels eines Reporters, der unter der Kontrolle des Enhancers und/oder Promotors des kompensatorisch hochregulierten Gens steht und in den Organismus eingeschleust wird. Geeignete Reporter sind dem zuständigen Fachmann bekannt, hier eignen sich insbesondere alle Arten von selbstleuchtenden Proteinen (z.B. GFP, BFP etc.), aber auch andere Reporter, mit denen ein detektierbares Signal erzeugt werden kann (z.B. Luziferase, β -

30 Galaktosidase) sowie Wachstumsmarker für auxotrophe Stämme wie z.B. HIS3,

URA3, LEU2, TRP1, und Antibiotika-Resistenz Gene wie z.B. für Kanamycin bzw. G418. Auch andere Arten der Phänotypisierung sind denkbar.

Im Anschluß an die Phänotypisierung ist es zweckmäßig, den Erfolg der Phänotypisierung durch geeignete Methoden (z.B. Messung der Proliferationsrate, Zellzählung oder Bestimmung von Größe oder Morphologie, etc. und Vergleich mit dem Phänotyp bei nicht erfolgender heterologer Expression) zu überprüfen.

Gemäß einer bevorzugten Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Phänotypisierung durch Deletion, Mutagenese oder Überexpression mindestens eines kompensatorisch regulierten Gens.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Phänotypisierung durch Minderung/Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Expression oder durch Markierung mindestens eines kompensatorisch differentiell regulierten Gens.

Die heterologe Expression kann dabei zur kompensatorischen Hoch- als auch Herunterregulation mindestens einer organismeneigenen Gens, aber auch dazu führen, dass eines oder mehrere Gene hoch-, eine oder mehrere andere herunterreguliert werden.

Besonders zweckmäßig ist es auch, wenn die heterologe Expression des Proteins oder -Fragments induzierbar ist. Geeignete Systeme sind dem zuständigen Fachmann bekannt, so eignen sich beispielsweise Galaktose-, oder Kupfer-regulierte Promotoren, das Tet-On Tet-Off System, etc. Dabei kann entweder die Expression eines dem Organismus fremden oder eigenen Gens induzierbar angeschaltet werden (induzierbarer Knock-In) oder die Expression eines dem Organismus eigenen Gens wird induzierbar vermindert oder ganz ausgeschaltet (induzierbarer Knock-Out). Hierbei umfasst die gentechnische Veränderung zweckmäßigerweise die Einschleusung eines Vektors, der die induzierbare Expression des Proteins oder Proteinfragmentes ermöglicht, vorzugsweise eines mit Galactose- (GAL1/GAL10) oder Kupfer- (CUP1) regulierten Promotoren. Tetracyclin induzierbaren Vektors oder gewebsspezifisch induzierbare Promotoren wie z.B. hsp16-2, unc-119, unc-54, mec-7, oder myo-3 in *C. elegans*.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der Organismus *C. elegans*, eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, und besonders bevorzugt eine Hefezelle, vorzugsweise eine Hefezelle vom Stamm *S. cerevisiae*.

Die Analyse der veränderten Genexpression wird bevorzugt durch DNA / RNA Profiling mit Hilfe von cDNA oder Oligonukleotid -Microarrays durchgeführt, kann aber grundsätzlich alle Veränderungen des mRNA oder Protein steady state (Transkription, Translation, Stabilisierung etc.) umfassen, und somit auch durch Protein Profiling genauso wie mit Hilfe Protein-arrays (erfolgen).

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens erfolgt die Phänotypisierung durch Minderung oder Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Regulation. Ist das kompensatorisch differentiell regulierte Gen stärker exprimiert als in Kontrollorganismen, erfolgt die Minderung oder Aufhebung durch vollständige oder teilweise Inhibierung der verstärkten Expression. Vorzugsweise erfolgt dies durch Kreuzung mit einem Deletionsstamm und anschließender Selektion der

Doppelmutanten (eignet sich insbesondere bei Hefe als Organismus), durch genomischen Knock Out mit geeigneten Vektoren (diese sind dem Fachmann bekannt und ebenfalls sehr gut geeignet in Hefen, hier vor allem *Saccharomyces cerevisiae*), der Mutagenese durch Strahlung und/oder mutagene Substanzen oder die Einschleusung von antisense Vektoren o.ä., die die Proteinproduktion des betreffenden Gens inhibieren. Hierbei ist es besonders vorteilhaft, wenn der Knock Out des kompensatorisch differentiell regulierten Gens den Knock In eines

Reportergens wie z.B. β -Galaktosidase, Luziferase, oder Wachstumsmarker wie HIS3, ADE2, URA3, oder Resistenzmarker wie z.B. für Kanamycin umfasst. Das Reportergen kann dann im nachfolgenden Assay als Signal genutzt werden, die Wirksamkeit der zu testenden Wirksubstanzen zu detektieren und zu quantifizieren.

Hierbei erfolgt vorzugsweise ein Austausch mindestens eines Teiles der kodierenden Sequenz des differentiell regulierten Gens gegen die kodierende Sequenz (umfasst auch Teile dieser Sequenz, die ausreichen, detektierbar zu sein) eines Reportergens (z.B. Luziferase, β -Galaktosidase etc). Ist das kompensatorisch differentiell regulierte Gen weniger stark exprimiert als im Kontrollorganismus, erfolgt die Minderung oder Aufhebung durch Verstärkung der Expression, vorzugsweise durch Einkreuzung, Einschleusung eines episomalen oder eines anderen

selektionsfähigen Expressionsvektors oder durch genomischen Knock-In (vorstehende Methoden eignen sich besonders gut für die Verwendung von Hefe als Organismus). Vorzugsweise führt die Minderung oder Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Regulation zu einer Wachstumsinhibierung des gentechnisch veränderten Organismus, andere Phänotypen können aber ebenso vorteilhaft sein.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf einen gentechnisch veränderten, phänotypisierten Organismus, der durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugt wurde.

Insbesondere betrifft die Erfindung einen gentechnisch veränderten Organismus mit gentechnisch veränderter Expression mindestens eines eigenen oder fremden Gens, die zur kompensatorisch differentiellen Regulation mindestens eines anderen, dem Organismus eigenen Gens führt, und so vorzugsweise das Auftreten eines auswertbaren/detektierbaren/nutzbaren Phänotyps unterbindet oder hemmt und mit durch Minderung/Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Expression des Gens oder durch Markierung des kompensatorisch differentiell regulierten Genproduktes herbeigeführten Phänotyp.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten gentechnisch veränderten Organismus zum Screening nach Substanzen mit einer Wirkung auf die Funktion des heterologen Proteins oder Proteinfragmentes sowie auf ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit einer Wirkung auf die Funktion des heterologen Proteins oder Proteinfragmentes.

Gemäß eines weiteren Aspektes, bezieht sich die Erfindung ebenso auf einen Assay zum Wirksubstanzscreening mit einem erfindungsgemäßen phänotypisierten Organismus durch Feststellung des Phänotyps (z.B. einer Wachstumsinhibierung infolge induzierter heterologer Überexpression eines Proteins), in Kontakt bringen der zu testenden Substanz mit dem Organismus und Beobachten einer möglichen Veränderung des Phänotyps, vorzugsweise dessen zumindest teilweisen Rückgang zu Verhalten bzw. Morphologie des Wildtyp-Organismus (also zumindest teilweise Wiederherstellung des Phänotyps des Ausgangsorganismus, z.B. Aufhebung der

Wachstumsinhibierung). Weiterhin sind Substanzen betroffen, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren oder einen erfindungsgemäßen Assay als wirksam identifiziert werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

5 Beispiel1: Entwicklung einer Plattformtechnologie zur Identifizierung von Wirksubstanzen, die sich auf die Aktivität von Kinasen auswirken, auf Basis von Hefe als Organismus. Der herbeigeführte Phänotyp ist in diesem Fall die Wachstumsinhibierung der Hefen. Das Testprinzip beruht somit auf der Wachstumsinhibierung von Hefen, die als lebendes „Reagenzglas“ verwendet werden. Unter Wachstumsinhibierung versteht man hier beispielsweise einen Zellzyklusarrest oder die Lyse der betroffenen Zellen. Hefen werden verwendet, da sie sich aufgrund ihrer genetischen Manipulierbarkeit ideal eignen. Humane (oder andere exogene) Kinasen werden in der Hefe unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors (GAL1/10) überexprimiert. Die Transformation und Kultivierung der Hefen erfolgt dabei nach Standardmethoden. Als Vektor werden z.B. Vektoren der Reihe p41x-GAL1 oder p42x-GAL1 verwendet.

In ca. 30% aller zu testenden Kinasen wird die Überexpression bereits zur Wachstumsinhibierung in Hefe führen (Tugendreich et al. (2001)). Dieses Vorgehen wird in der Figur 1 mit den Schritten 1,3,5 dokumentiert. Kinasen, deren Überexpression zur Wachstumsinhibierung führt, werden in einen geeigneten Hefestamm integriert und anschließend ins Hochdurchsatzscreening (HTS) überführt. Hefestämme vom Stammbintergrund „MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0“ (BY4741 von EUROSCARF) werden in diesem Beispiel verwendet.

Während der Assayentwicklung für das HTS werden die Bedingungen optimiert, indem verschiedene „Drug Transporter“-Deletionsmutanten im oben beschriebenen Stammbintergrund getestet werden. Für alle in diesem Beispiel zu testenden Proteinkinasen werden die Stämme mit den folgenden Deletions-Kombinationen getestet: 1. YRWS21 (MATa pdr1Δ::KanMX pdr3Δ::KanMX his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0) 2. YRWS39 (MATa pdr5Δ::KanMX yor1Δ::KanMX his3Δ1 leu2Δ0 MET15 lys2Δ0 ura3Δ0) 3. YRWS14 (MATa pdr5Δ::KanMX snq2Δ::KanMX his3Δ1

leu2Δ0 MET15 lys2Δ0 ura3Δ0)4. YRWS13 (MATa snq2Δ::KanMX⁺ yor1Δ::KanMX⁺ his3Δ1 leu2Δ0 MET15 lys2Δ0 ura3Δ0) 5. YRWS44 (MATa pdr5Δ::KanMX⁺ snq2Δ::KanMX⁺ yor1Δ::KanMX⁺ his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0).

Im Hochdurchsatzscreening kann dann nach biologischen und chemischen

- 5 Molekülen gesucht werden, die die Wachstums hemmung mindern oder aufheben – d.h., die zum Wachsen der Hefekulturen führen. Alle bislang beschriebenen Techniken sind dem zuständigen Fachmann bekannt.

Wie oben beschrieben, verursachen ca. 30% aller exogenen Kinasen

Wachstumshemmung in der Hefe. Daher verursachen ca. 70% aller

- 10 überexprimierten Kinasen keine oder nur geringe Wachstumshemmung. Um das

Prinzip der Wachstumshemmung der Hefe als Plattformtechnik für das

Compoundscreening von allen Proteinkinasen zu nutzen, müssen auch die

verbleibenden 70% der Proteinkinasen eine Wachstumshemmung hervorrufen. Dazu bedarf es der vorliegenden Erfindung.

15

Die gewünschten Proteinkinasen werden in einen Hefe-Expressionsvektor der Wahl, in diesem Beispiel p413 GAL1 (D. Mumberg et al. (1994) in Volllänge und mit einem C-terminalen Tag, z.B. MYC-Tag) kloniert. Nach Transformation mit der Lithium-Azetat Methode nach Standardprotokoll (s. Methods in Yeast Genetics) und Kultivierung in einem geeigneten Medium wird die Überexpression der exogenen Kinasen in der Hefe durch Zugabe von Galaktose nach Standardprotokoll (20 g/ml Medium) für 4 bis 6 Stunden bei 30°C induziert. Die Expression der Kinasen wird durch Immunoblots nach Standardprotokoll mit Hilfe von Antikörpern gegen den gewählten Tag (z.B. anti-MYC: AB1364 (Chemikon) oder M5546 (Sigma); anti-HA: HA-11-A (Biotrend) oder 55138 (ICN)) überprüft.

25

Nach dem immunologischen Expressionsnachweis in der Hefe werden Veränderungen der Genexpression – ausgelöst durch die Expression der exogenen Kinasen – in der Hefe (die kompensatorisch differentielle Regulation) mit Hilfe von DNA-Microarrays untersucht. DNA-Microarrays sind Trägermaterialien, an welche

spezifische Oligonukleotide chemisch gekoppelt sind. Die einzelnen Oligonukleotide repräsentieren hier individuelle Gene. DNA-Microarrays werden als Werkzeuge eingesetzt, die das momentane Expressionsmuster des gesamten Genoms der Hefe abdecken können. Für solch ein Experiment werden Kinase-transformierte Hefen mit mock-transformierten (leeres Plasmid) Hefen als Kontrolle verglichen. Aus beiden Stämmen wird die Gesamt-RNA mit Standardmethoden präpariert. Die RNA wird dann mit den Chip-gekoppelten Oligonukleotiden (auf den Microarrays) bei 45°C für 16h hybridisiert. Der direkte Vergleich der Kinase-transformierten Hefe-RNA mit der mock-transformierten Hefe-RNA deckt Hefegene auf, die durch eine überexprimierte Proteinkinase kompensatorisch differentiell reguliert werden. Untersuchungen der Erfinder haben gezeigt, dass durch einen genetischen Eingriff, z.B. bei der Überexpression einer exogenen Proteinkinase, eine bestimmte Anzahl an RNAs für Hefegene hochreguliert und eine bestimmte Anzahl herunterreguliert wird (Tabelle 1). Das wurde am Beispiel der humanen Kinase PAK1 durchgeführt.

- 15 Tabelle 1: 2 Gene werden hochreguliert, 11 Gene werden herunterreguliert. Ferner konnten die Erfinder erstmals zeigen, dass viele der hochregulierten Gene aus kompensatorischen Gründen hochreguliert werden. In diesem Fall wurde ein *S. cerevisiae* Wildtypstamm (W303-1a (Stammhintergrund oder Bezugsquelle))

verglichen mit Stamm, der eine Deletion im *Saccharomyces cerevisiae* Gen *cla4* (Δ cla4) (YEL252) hat. Bis auf die Deletion in dem Gen für CLA4 sind beide Stämme isogen, d.h. identisch. Beim direkten Vergleich der RNA-Präparationen aus den zwei verschiedenen Stämmen (W303-1a und YEL252) tauchten 110 verschiedene RNAs aus dem Hefegenom als hochreguliert auf (Tabelle 2).

- 20 Tabelle 2: 56 Gene wurden herunterreguliert (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der RNA-Kopienzahl für bestimmte Gene könnte dabei möglicherweise aus kompensatorischen Gründen auftreten. Kompensatorisch bedeutet in diesem konkreten Beispiel, dass der durch die Deletion des CLA4-Gens verursachte Defekt im gentechnisch veränderten Stamm durch die vermehrte Expression von Genen abgeschwächt werden soll, die die Funktion von CLA4 ganz oder teilweise übernehmen können. Um diese These zu beweisen, wurden einige der hochregulierten Gene für weiterführende Experimente ausgewählt (siehe „2. Deletion“ in Tabelle 3).

30

Tabelle 3: Dazu wurden MAT \square -Hefestämme ausgesucht (können z.B. von EUROSCARF oder Research Genetics bezogen werden), die Deletionen in den jeweils hochregulierten Genen tragen. Die Deletionen sind mit Markergenen gekennzeichnet, d.h. Markergene z.B. für eine Antibiotika-Resistenz oder für notwendige Wachstumsfaktoren wie z.B. bestimmte Aminosäuren sind in das jeweilige Hefegenom integriert. Die ausgesuchten Deletionsstämme wurden nach hefe genetischen Standardmethoden (Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Course Manual (1994)) mit dem CLA4-Deletionsstamm (YE1252, MATa) gekreuzt.

10 Nach der Kreuzung wurde auf diploide Hefen selektiert. Die wurden zur Sporenbildung veranlasst. Dabei entstehen aus einer diploiden Hefezelle, 4 haploide Sporen, die zur Keimung in 4 haploide Hefeklone aufgeteilt werden können. Demnach kommt es zur Neuverteilung der Gene aus dem diploiden Stamm. In 25% aller Fälle werden die 2 Deletionen der unterschiedlichen Ausgangsstämme in einem neuen haploiden Klon vereint sein. Das kann anhand der verschiedenen Selektivmarker einfach verfolgt werden.

15 Mit dieser Standardmethode wurde versucht 13 verschiedene Doppeldelationen herzustellen. In nur 10 Fällen waren die Doppeldelationen lebensfähig, in 3 Fällen kam es nie zu der Doppeldelation (Tabelle 3 „lethal“). In allen 3 Fällen wurden 40 Asci getestet. Daher ist klar, dass die Kombination beider Deletionen zum Absterben der betroffenen Spore führt. Sie sind also synthetisch lethal. Es konnte gezeigt werden, dass in allen 13 Fällen, die Doppeldelationen entweder synthetisch lethal waren oder anderweitige synthetische Phänotypen gezeigt haben (Tabelle 3). Diese Untersuchung bestätigt die These, dass die betroffenen Gene hochreguliert wurden, um Defekte, ausgelöst durch das Fehlen von CLA4, zu kompensieren. Für die Erfindung ist wichtig, dass in den untersuchten Fällen (13 Doppeldelationen) 3 Kombinationen und damit 23% aller möglichen Doppeldelationen synthetische Lethalität zeigten (Tabelle 3).

25 Im Experiment mit dem \square cla4-Stamm wurden 110 Gene hochreguliert (Tabelle 2). Auf die gleiche Weise wurden im oben beschriebenen Ansatz durch die Überexpression von humanem PAK1 die mRNAs für 2 Gene hochreguliert (Tabelle

1) Folglich werden auch diese Gene aus kompensatorischen Gründen hochreguliert. Aufgrund der geringen Anzahl an hochregulierten Genen und der damit verbundenen niedrigen Erfolgsrate für synthetisch lethale Kombinationen, verzichteten wir auf das Folgeexperiment, Stämme zu identifizieren, die in der Kombination aus Deletionen in den hochregulierten Genen (mit YMR096W oder HIS3 aus Tabelle 1) und der Expression von humanem PAK1 einen synthetisch lethalen Phänotyp zeigten. Vielmehr wurde eine hyperaktive Mutante von humanem PAK1 hergestellt, nämlich humanes PAK1 \square CRIB. Diese Mutante wurde wieder mit Standardmethoden in Hefe transformiert. Aufgrund der hohen Kinaseaktivität löste dieses Proteins Wachstumshemmung in der Hefe aus. Ein geeigneter Stamm zum Testen für niedermolekulare Substanzen war identifiziert. Das Ziel war erreicht. Trotzdem wurde auch für diesen Fall ein differentielles Expressionsprofil mit den DNA-Microarrays aufgenommen, um die Validität der Erfindung zu untermauern (Tabelle 4).

15 Tabelle 4: 55 verschiedene Hefegene wurden aufgrund der hohen Kinaseaktivität kompensatorisch hochreguliert, 3 Gene wurden herabreguliert (nicht gezeigt). Für den Fall, dass die hohe Aktivität der PAK1-Mutante nicht ausreichte hätte, um Wachstumshemmung in der Hefe auszulösen, könnten nun Deletionsstämme für die hochregulierten Gene getestet werden. Die PAK1-Mutante müsste in den jeweiligen Deletionsstämmen exprimiert werden. Den Wert einer 23%-igen Erfolgchance auf einen synthetischen Phänotyp zugrundelegend, würden dann in ca. 13 Hefestämmen die Expression der humanen PAK1-Mutante Wachstumshemmung hervorrufen. Damit wäre ein Stamm zum Testen von potenziellen Kinaseinhibitoren identifiziert.

25 In dem Fall des Testens von humanen Kinasen in der Hefe müssten die Ausgangsstämme nicht gekreuzt werden, da die humanen Kinasen Galaktose-abhängig von einem Plasmid exprimiert wird. Dieses Plasmid muss nur in den jeweiligen Deletionsstamm transformiert und die Expression der Kinase induziert werden. In 23% aller Fälle der zu testenden Stämme wird Wachstumshemmung (Lethalität) beobachtet werden können. Die wachstumsgehemmten Stämme können aufgrund der jeweiligen Deletionen die Expression der plasmidkodierten

Proteinkinase nicht mehr kompensieren. Damit können diese Systeme ins HTS überführt werden.

Sollte eine Überexpression von bestimmten Wildtyp-Kinasen in Kombination mit dem DNA-Microarray-Experiment nicht ausreichen (wie oben für Wildtyp-PAK1 beschrieben, siehe Tabelle 2) um Wachstumshemmung hervorzurufen, dann werden Mutanten der jeweiligen Kinase hergestellt und anstelle der Wildtypkinasen eingesetzt (auch für die Genexpressionsexperimente mit den DNA-Microarrays). Diese Mutanten können nach dem Prinzip der zufälligen Mutagenese hergestellt werden, mit dem Ziel hyperaktive Mutanten zu gewinnen. Zur Mutagenese werden die Kinasekonstrukte mit einem C-terminalen Tag nach der Methode von Tugendreich et al. (2001) verwendet.

Es wurde somit durch Arbeiten der Erfinder erstmals und überraschend gezeigt, dass die Deletion von kompensatorisch differentiell Regulierten Genen zur Wachstumshemmung führen kann und der damit verbundenen Erkenntnis einen standardisierten Plattformassay für Proteinkinasen aufzubauen. In den aktuellen Experimenten wurde Wachstumshemmung mit einer Frequenz von 23% nachgewiesen. Die Deletionsstämme, die nach der Transformation mit der plasmidkodierten Proteinkinase Wachstumshemmung zeigen, können nun wie oben beschrieben durch Optimierung (Austesten der verschiedenen „Drug-Transporter-Knockouts“) ins HTS überführt werden. In der Figur 1 ist die Erfindung beispielhaft an Hand der Punkte 1, 4, 6-10 dargestellt.

Außer durch Einkreuzung der Deletionen kompensatorisch differentiell regulierter Gene hätte deren Deletion auch durch andere Methoden, wie genomischen Knock Out der Kinase exprimierenden Hefe selbst erfolgen können. Bei Hefen ist jedoch die Ausschaltung kompensatorisch differentiell regulierter Gene durch Einkreuzen von Deletionen oder der genomische Knock Out aufgrund der Einfachheit der Vorgehensweise besonders vorteilhaft. Bei anderen Organismen können sich demgegenüber eher andere Methoden eignen. So ist im Beispiel von eukaryontischen Zelllinien, und im Falle von mehrzelligen Organismen, wie Drosophila oder C. Elegans eher die Anwendung von Antisense-Verfahren wie RNAi

geeignet. Die Auswahl von jeweils für die einzelnen Organismen geeigneten Maßnahmen liegt im Bereich fachmännischen Könnens.

Der erfindungsgemäße Plattformassay ermöglicht das HTS aller Proteinkinasen (wie an Hand von humanem PAK1 beschrieben) in homogenen und daher kostengünstigen Assaysystemen. Das System ist auch zur Bestimmung von IC₅₀-Werten im Compoundscreening geeignet.

Die Genexpressionsexperimente führen, wie im Beispiel beschrieben, auch zur Identifizierung von RNAs von Genen, die durch die Expression von exogenen Kinasen reprimiert werden. Die Promotoren dieser reprimierten Gene können im HTS als Reporter dienen. Dazu werden die Hefepromotoren an sogenannte Reportergene wie β -Galactosidase, Luciferase, Wachstumsmarker wie HIS3, URA3, LEU2, oder TRP1, etc. fusioniert. Diese Konstrukte werden in den Hefestamm für das HTS transformiert. Dort dienen sie als Wachstumsmarker für Verbindungen, welche die Wachstumshemmung in dem betroffenen Stamm aufheben.

Beispiel 2: Der Plattformassay kann auch als sogenanntes Multiplexsystem eingesetzt werden. Unter Multiplexsystem wird verstanden, daß verschiedene Proteine oder Proteinfragmente z.B. Kinasen im gleichen Assay zur gleichen Zeit in einem Ansatz getestet werden. Dazu werden zunächst die individuellen phänotypisierten Hefestämme konstruiert. Die exogenen Proteinkinasen werden mit Standardmethoden integriert (s.o.). Dann werden diese Hefestämme zu einer homogenen Kultur vermischt. Die Expression der Proteinkinasen in dem homogenen Hefestamm Gemisch führt zur Wachstumshemmung, da auch die Expression jeder einzelnen Kinase an sich im phänotypisierten Hefestamm Wachstumshemmung auslöst. Im HTS werden Verbindungen identifiziert, die zum Wachstum von mindestens einem Hefestamm führen. Nun gilt es, den Verbindungen die betroffene Kinase zuzuordnen. Das wird über die sogenannte „colony PCR“ Methode (A.J.P. Brown and M. Tuite (1998)) erreicht. Dazu werden einige, wenige Mikroliter aus den wachsenden Hefekulturen nach Anleitung (A.J.P. Brown and M. Tuite (1998)) lysiert. Aus (dem Gemisch an) genomischer DNA (inklusive integrierten Proteinkinasen) wird/werden mit spezifischen Primern für die unterschiedlichen Proteinkinasen die betroffene(n)/gehemmte(n) Kinase(n) durch quantitative RT-PCR zweifelsfrei

identifiziert. Somit können durch das Mischen von verschiedenen Hefestämmen zu gleichen Teilen, unterschiedliche Kinasen in einem einzigen Screen getestet werden. Der Vorteil ist eine enorme Kosten- und Zeitersparnis.

Diese Technologie ist nicht nur auf Proteinkinasen anwendbar, sondern auf alle Proteine oder Substanzen, die eine transkriptionelle Antwort in der Hefe auslösen.

Dieser Plattformassay ermöglicht im Gegenstand zu Assays des Standes der Technik z.B. das HTS aller Proteinkinasen (nicht nur solcher, die bereits auf Anhieb bei heterologer Expression einen Phänotyp hervorbringen) in homogenen und daher kostengünstigen Assaysystemen. Das System ist auch zur Bestimmung von IC₅₀-Werten im Compoundscreening geeignet.

Diese Technologie ist nicht nur auf Proteinkinasen anwendbar, sondern auf alle Proteine oder Substanzen, die eine transkriptionelle Antwort in der Hefe auslösen.

Methoden:

Für genetische Manipulationen wurden die Standardmethoden nach Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 545 pp. eingesetzt. Wachstumsbedingungen, Kreuzungsbedingungen und genetische Manipulationen an Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden gemäß Guthrie, C. and G.R. Fink (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Volume 194, J.N. Abelson and M.I. Simon, eds. (San Diego, CA: Academic Press Inc.) durchgeführt. Die Affymetrix-Experimente ("gene expression analysis") wurden exakt nach Kleibl et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 714-720 durchgeführt.

Literatur:

Brown, A.J.P. and M. Tuite (1998), *PCR-Based Gene Targeting in Saccharomyces cerevisiae*. Methods Microbiol. **26**, 67-81.

Methods in Yeast Genetics; A Cold Spring Harbor Course Manual; 1994 Edition; Kaiser, C., Michaelis, S., and A. Mitchell; Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mumberg, D., Müller, R. and M. Funk (1994), *Regulatable promoters of Saccharomyces cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression*. Nucl. Acids Res. **22**, 5767-5768.

Tugendreich, S., Perkins, E., Couto, J., Barthmaier, P., Sun, D., Tang, S., Tulac, S., Nguyen, A., Yeh, E., Mays, A., Wallace, E., Lila, T., Shivak, D., Prichard, M., Andrejka, L., Kim, R. and T. Melese (2001). *A streamlined process to phenotypically profile heterologous cDNAs in parallel using yeast cell-based assays*. Genome Res. **11**, 1899-1912.

Tabelle 1:

2 Gene sind hochreguliert im ste20Δ Stamm YEL206, der hPAK1 exprimiert

Anmerkungen	Genfunktion	x-fach hoch reguliert
YMR096W	Stationärphasenprotein	2.15
HIS3	Imidazolglycerolphosphat Dehydratase; 7. Schritt der Histidin Biosynthese	6.77

11 Gene sind herunterreguliert im ste20Δ Stamm YEL206, der hPAK1 exprimiert

Anmerkungen	Genfunktion	x-fach herunter reguliert
STE20	Serine/Threonine Proteinkinase des Phäromonresponse Signaltransduktionsweges	47.62
FRE7	Protein mit schwacher Ähnlichkeit zu Fre1p und Fre2p, involviert in den Eisentransport	11.70
MFA1	Matingpheromon α-Faktor, exportiert aus der Zelle durch Ste6p	3.70
YLR042C	Unbekannt	3.27
GPH1	Glykogenphosphorylase, setzt α-D-Glukose-1-Phosphat frei	2.83
FRE1	Eisen- und Kupferreduktase, wirkt auf Fe2+ Ionen Chelate	2.55
YHR087W	Unbekannt	2.31
CWP1	Mannoprotein der Zellwand; Mitglied der PAU1 Familie	2.27
YJL217W	Unbekannt	2.25
CTR1	Kupfer Transportprotein; benötigt für hochaffine Aufnahme von Kupfer Ionen;	2.17
FET4	Niedrigaffines Fe(II) Transportprotein	2.00

Tabelle 2:

110 Gene sind hochreguliert im claf4 Stamm YEL252

Anmerkungen	Genfunktion	x-fach hoch reguliert
Zellwand Aufrechterhaltung		
FKS2	Bestandteil der 1,3-Glucansynthase, funktioniert wahrscheinlich als alternative Untereinheit zu Fks1p (88% identisch); 55% identisch mit Fks3p; interagiert mit Rho1p; fks1Δfks2Δ ist letal	6.81
ECM29	Möglicherweise involviert in Zellwandstruktur oder Biosynthese	3.13
SPI1	Durch GPI Anker an die Zellwand gebunden; induziert durch Msn2/4p	2.72
SBE22	Notwendig für Wachstum der Buds; involviert in die Integrität der Zellwand	2.08
Zellulärer Stress		
HSP12	12 kDa Heat Shock Protein, induziert durch Hitze, osmotischen (HOG1-, PBS2-dependent) oder oxidativen Stress, stationäre Phase, HSF1, MSN2, YAP1; Chaperon (Mitglied der Hydrophilin Familie); 5 STRES	6.55
HSP26	Heat Shock Protein, induziert durch Osmostress, HSF1, MSN2, Hitze, H ₂ O ₂ ; 29% identisch mit Hsp42p; Chaperon; 4 STRES	4.76
HSP82	Heat Shock Protein, 97% identisch mit Hsc82p, ähnlich dem Säuger HSP90 (komplementierbar durch humanes HSP90); Chaperon; induziert durch HSF1, SKN7, YAP1, H ₂ O ₂ ; hat ATPase Aktivität; z.T. reguliert durch den HOG1 Signalfweg, bindet an Ste11p; HSP90 Aktivität wird durch Sch9p moduliert	2.67
GPX2	Glutathionperoxidase, induziert durch YAP1 & Oxidantien	2.64
SKN7	Transkriptionsfaktor involviert in die Antwort auf oxidativen Stress (H ₂ O ₂) & G1 Zellzykluskontrolle (Auftreten der Buds); interagiert mit Rho1p, Mbp1p, Cdc42p & genetisch mit PKC1; benötigt für das N ₂ -Entzug-induzierte pseudophyphale Wachstum; Kooperiert mit Yap1p bei der Genexpressionsinduktion; nicht involviert in den Heat Shock; Wirkt ggf im HOG1 Signalfweg mit; Teil eines Zweikomponentensystems; Transkriptionsaktivierung stimuliert durch Skn7p ist abhängig vom Ras/PKA Signalfweg	2.60
SOD2	Mitochondriale Mn2+ Superoxidodismutase, induziert durch HAP1, 2, 3, 4, 5 & reprimiert durch cAMP (RAS2); transkriptionelle Antwort auf H ₂ O ₂ is Yap1p- & Skn7p-abhängig; induziert durch Msn2/4p	2.57
ICT1	k.o. höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber	2.41

	Cu2+ als Wildtyp; mitochondriale Energie Transfer Signatur	
CYP2	Mitglied der Cyclophilin Familie, Heat Shock Protein, Isomerase, Chaperon	2.37
HSP42	Heat Shock Protein, involviert in die Wiederherstellung des Zytoskeletts während leichter Stressenwirkung; induziert durch HOG1, MSN2/4, EtOH, H ₂ O ₂ , 3 STRES	2.28
MSN4	Transkriptionsfaktor, starke Ähnlichkeit zu Msn2p; Regulation der Trehalosekonzentration während Stress; 39 Gene abhängig von Msn2/4p für die Induktion bei diauxischem Shift und reprimiert durch cAMP; ALD3, GDH3, GLK1, HOR2, HSP104, HXK1, PGM2, SOD2, SSA3, SSA4, TKL2, TPS1, ARA, z.B. Ras2p kontrolliert die Stressresponse-Genexpression durch Msn2/4p & Yap1p; TOR-Signaltransduktion kontrolliert die nukleäre Lokalisation von Nährstoff-regulierten Transkriptionsfaktoren	2.15
Nukleotid Stoffwechsel		
ADE2	Phosphoribosylaminimidazol Karboxylase (AIR Dekarboxylase); weisse vs. rote Kolonien	5.96
ADE17	5-Aminimidazole-4-Karboxamid Ribonukleotid (AICAR) Transformylase/IMP Zyklodehydratase; weisse vs. rote Kolonien	3.42
DCD1	Deoxycytidylat Deaminase; k.o. hat gesteigerten dCTP Pool	2.50
Transport kleiner Moleküle		
FRE7	Involvid in uptake of copper and iron; weak similarity to Fre1p	4.98
YHR048W	29% identical to Ygr138p, Ypr156p, and 33% to Fir1p; MFS-MDR member	4.20
PHO89	High-affinity Na+-dependent phosphate transporter;	2.76
YGR138C	Member of the cluster I (family1) of the MFS-MDR; 89% identical to Ypr156p	2.54
YER053C	MCF member	2.40
TAF1	Triacetylflucerinine C transporter (MDR-MFS); 58%, 46%, 46% identical to Arn1p, Ycd073p, Ykr106p	2.24
MUP3	Low affinity amino acid permease (Met permease); APC family member	2.16
ATM1	ABC superfamily member, required for growth; may function in sensing iron; 43% identical to human ABC7	2.03
Carbohydrate metabolism		
GRE3	NADPH-specific aldose reductase, induced by osmotic stress, MSN2/4, 0.1M LiCl; 36%, 34%, 34% identical to Ypr096p, Gcy1p, Ypr1p; STRES and POSES; similar to human 305B protein (neonatal cholestatic hepatitis)	3.61
GPH1	Glycogen phosphorylase repressed by cAMP; stress-inducible	3.49
GUT1	Glycerol kinase, catalyzes conversion of glycerol to glycerol-3-phosphate, induced by ADRI, INO2, INO4, glycerol, strong similarity to human GK; activity is reduced during osmotic stress	3.37

PCY1	Pyruvate carboxylase I; converts pyruvate to oxalacetate for gluconeogenesis; 93%, 30%, 38% identical to Pyc2p, Hfa1p, Durt12p; similar to human PYC	2.50
TSL1	Component of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex; induced by STE12, STE7, TEC1, osmotic stress & repressed by cAMP, glucose; contains STRES	2.40
GLK1	Glucokinase specific for aldohexoses; 73%, 38%, 37% identical to Ydr516p, Hxk1p, Hxk2p; induced by GCR1, HOG1, MSN2, MSN4 & repressed by cAMP, cold; protein increased upon H ₂ O ₂ , G1 phase	2.09
YPS3	GPI-anchored aspartyl protease (yapsin) at the plasma membrane; 45%, 36%, 47% identical to Mkc7p, Sst1p, Yps1p	3.40
UBI4	Ubiquitin polyprotein, mature ubiquitin is cleaved from polyubiquitin (Ubi4p) or from fusions with ribosomal proteins Rps31p, Rpl40Ap, Rpl40Bp; ribosomal heat shock protein & protein conjugation factor; 90% identical to Rpl40A/Bp and 100% to Rps31p; induced HSF1, MSN2, starvation, heat shock; required for survival of cell stress; k.o. is hypersensitive to H ₂ O ₂ , N ₂ and C ₂ starvation; has STRES & HSEs	3.27
VID24	Required for vacuolar import and degradation of Fbp1p	2.82
RPN10	Non-ATPase component of the 26S proteasome complex, binds ubiquitin-lysozyme conjugates in vitro; C-terminus binds to ubiquitin	2.46
BUL1	Involved in ubiquitination pathway, binds to ubiquitin ligase	2.12
AAP1	Ala/Arg aminopeptidase, related to other Zn2+ metalloproteases & mammalian Zn2+ aminopeptidases	2.00
DNA synthesis		
RIM1	Transcription factor which binds ssDNA; required for replication in mitochondria	3.27
Amino acid metabolism		
YMR250W	Similar to glutamate decarboxylase	3.11
GDH2	Glutamate DH, primary pathway to generate NH ₄ ⁺ from glutamate, induced by rapamycin; gets phosphorylated in response to N ₂ starvation (inactivation; PAK-dependent)	2.83
GCY1	Glycine decarboxylase T subunit, functions in pathway for Gly degradation	2.31
CHA1	Mitochondrial L-Ser/L-Thr deaminase, catalyzes conversion of Ser to pyruvate & Thr to D-ketobutyrate; induced by Ser, Thr, SIL1, CHA4	2.17
Signal transduction		
YGL179C	Ser/Thr protein kinase with similarity to Elm1p (31%), Pak1p (49%), Kin82p (30%), Gin4p (29%)	3.10
KSP1	Ser/Thr protein kinase that suppresses prp20Δ when overexpressed	2.85
SLT2	Ser/Thr protein kinase of the MAP kinase	2.77

	family involved in the cell wall integrity pathway, polarized growth, response to nutrient availability, heat shock; interacts with Rim1p, Swi4/6p, Mkk1/2p, Spa2p, Ptp2/3p, phosphorylates Swi4/6p & functions as regulator of the SBF complex; kinase activity induced by pheromone (requires Ste20p, but not Ste12p); kinase activity is cell cycle regulated	
STE20	Ser/Thr protein kinase of pheromone response pathway, participates also in filamentous growth and STE vegetative growth pathways;	2.25
YCK1	CKI isoform, 77% 50%, 41% identical to Yck2p, Yck3p, Hrr25p and 50-55% with human isoforms; geranylgeranylated; yck1Δyck ^{ts} displays hyperpolarized growth, hypersensitivity towards Zn ²⁺ and multiple drugs, resistance to Mn ²⁺	2.21
YHR046C	Myo-inositol-1(or-4)-monophosphatase, participates in inositol cycle of Ca ²⁺ signaling & inositol biosynthesis; similar to human MYOP (anti-manic, and – depressive actions of Li ⁺)	2.17
SCH9	Ser/Thr protein kinase activated by cAMP; 46%, 44%, 42% identical to Ypk2p, Ypk1p, Tpk3p & 49% to human AKT1.2; controls FGM pathway, k.o. has modest defect in pseudohyphal growth and displays hyperinvasive growth	2.17
PTP2	PTPase involved in Hog1p and pheromone response pathways; interacts with Hog1p, Sit2p; induced by SLT2, YAP1, heat, osmotic stress; dephosphorylates Hog1p, Fus3p; posttranslationally regulated by Hog1p; 2 STRs	2.01
Lipid, fatty acid & sterol metabolism	Phospholipase B, releases GPI into the medium	3.01
ERG7	Lanosterol synthase (ergosterol biosynthesis), essential	2.30
YHR138C	Involved in vacuolar fusion with sequence similarity to Pbi2p	2.81
PCL5	Cyclin that associates with Pho85p, belongs to Pcl1/2p subfamily	2.73
GAT2	GATA Zn ²⁺ finger transcription factor, required for expression of N ₂ catabolite repression-sensitive genes	2.73
HAP4	Transcription factor, component of the Hap2/3/4/5p-complex involved in activation of CCAAT box-containing genes (SOD2, e.g.)	2.48
STP4	Transcription factor with strong homology to Stp1.2.3p; involved in tRNA splicing and branched-chain amino acid uptake	2.17
SNF6	Transcription factor, component of the SWI-SNF global transcription activator complex; acidic domains of Gcn4p, Swi5p, Hap4p interact directly with SWI-SNF complex	2.13

SET1	Transcription factor of the trithorax family of SET-domain-containing proteins, participates in control of transcription and chromosome structure; similar to human HRX Zn ²⁺ finger protein	2.04
MDH2	Cytosolic malate DH (glyoxylate cycle); induced by N ₂ source limitation & repressed by cAMP, glucose, 3 STRs	2.60
RPP1	Subunit of ribonuclease P & RNase MRP ribonucleoprotein particles, needed for tRNA & 5.8S rRNA processing; 23% identical to hRpp30	2.49
PRP8	U5 snRNA-associated splicing factor; essential RNA-binding protein; 62% identical to human PRP8; component of the spliceosome	2.41
RRP4	3'-5'-exoribonuclease required for 3'-processing of ribosomal 5.8S rRNA; component of the nuclear & cytoplasmic forms of the 3'-5'-exosome complex; essential; induced in S-phase	2.38
DBP8	Similar to DEAD box family of RNA helicases	2.33
YNL274C	Potential α -ketolacopate reductase, induced by YAP1, H ₂ O ₂	2.26
DUR1,2	Urea amidolyase, contains urea carboxylase & allophanate hydrolase activities; repressed by NH ₄ ⁺ & induced by N ₂ starvation, mating pheromone, Arg, rapamycin (N ₂ utilization gene)	2.21
UBP5	Ubiquitin-specific protease homologous to Doa4p & human Tre-2; member of rhodanese homology family	2.17
MSR1	Mitochondrial arginyl-IRNA synthetase, 61% identical to Ydr341p	2.17
SFB3	Possible component of COPII vesicles, involved in transport of Pma1p from eR to Golgi; interacts with Sec23p	2.17
CDC12	Essential part of the septin complex at the neck; required for pheromone-induced morphogenesis; septin assembly depends on Cla4p & Ste20p (Cdc42p, Cdc24p); mislocalized in yck2 ^{ts}	2.09
SSF1	Suppressor of sterile four; 94% identical to Ssf2p, ssf1Δssf2Δ is lethal; multicopy suppressor of hsp90-loss-of-function mutation	2.06
Unknown	YHR214W	9.88
YHR066W	100%, 77%, 74% identical to Yhr214p, Yil169p, Yol155p	7.59
RTA1	Resistant to aminocholesterol; induced by TEC1, STE7, STE12	4.64
MSC1	Functions in the meiotic homologous chromatin recombination pathway	4.62
YHL021C	Induced by STE12, TEC1, STE7	4.35
YHR209W	Putative SAM-dependent methyltransferase	4.26
COS8	Protein family of conserved sequences	3.74

YNR014W	30% identical to Ymr206p; 4 putative STREs	3.44
YIR042C	-	3.37
YCL049C	-	3.28
YHR087W	-	3.19
YHR078W	4 potential transmembrane segments	3.00
TRA1	Essential component of the Ada-Spt transcriptional regulatory complex (SAGA), SAGA-like complex, & NuA4 complex	2.82
BTN2	Elevated expression with yhc3Δ; 38% identical to human HOOK1	2.77
VAB36	Vac8p-binding protein of 36 kDa; 2 putative STREs	2.75
YFL063W	Similar to subtelomeric proteins	2.68
YHR112C	Similar to cystathione D-synthase Sit2p & other transsulfuration enzymes, also similar to human CGL (cystathioninuria)	2.56
YBL064C	Mitochondrial thiol peroxidase of the 1-Cys family; one of the 4 peroxidases in S.c.; uses thioredoxin as electron donor; induced upon oxidative stress; reduces H ₂ O ₂ in the presence of DTT	2.55
YSC83	Induced mRNA levels during sporulation	2.46
BOP1	Bypass of PAM1 (PAM1 = multicopy suppressor of loss of PP2A)	2.45
YHR045W	5 potential transmembrane domains	2.44
YHR033W	Induced by N ₂ source limitation & repressed by cAMP	2.42
YPR009W	Putative Zn ²⁺ -finger domain; 34% identical to 2.40 Sut1p	2.40
YLL064C	Member of the seripauperin family	2.39
YPL137C	Similar to Mhp1p (27%), Yor227p (43%)	2.39
YHR182W	-	2.37
YDR222W	-	2.37
YHR146W	Similar to pheromone adaption protein Mdg1p	2.36
YMR184W	-	2.36
YGL261C	Member of the seripauperin (PAU) family	2.34
YHR083W	Essential	2.32
YHR122W	Essential	2.29
YOR227W	43%, 25% identical to Ypl137p, Mhp1p	2.27
YHR186C	WD40 domain; essential	2.26
YHR073W	Similar to human oxysterol-binding protein; interacts with Spo12p	2.20
YJL217W	-	2.17
YHR192W	-	2.11
YDL231C	Putative Zn ²⁺ -finger domain	2.10
YDR391C	57%, 41% identical to Yor013p, Yor012p	2.05

Tabelle 3:

Name des Stammes	1. Deletion	2. Deletion	Phänotyp
W303-1a	-	-	kein
YEL252-1a	clā4	-	Zytokinase
YAS	clā4	ptp2	synthetisch
YAS	clā4	glk1	synthetisch
YAS	clā4	msn4	synthetisch
YAS	clā4	ygl173	synthetisch
YAS	clā4	gut1	synthetisch
YAS	clā4	rtā1	geheilt
YAS	clā4	skn7	synthetisch
YAS	clā4	pde2	synthetisch
YAS	clā4	yck1	synthetisch, extrem langsames Wachstum
YAS	clā4	sbe22	synthetisch
YAS	clā4	elm1	lethal
YAS	clā4	slt2	lethal
YAS	clā4	ste20	lethal

Tabelle 4:

55 Gene sind hochreguliert im ste20Δ Stamm YEL206, der hPAK1ΔCRIB exprimiert

Anmerkungen	Genfunktion	x-fach hoch reguliert
PHO5	Reprimierbare saure Phosphatase; benötigt Glykosylierung für Aktivität	10.19
ZRT1	Hochaffines Zink Transportprotein; Mitglied der ZIP Familie	10.12
PHO11	Sezernierte Saure Phosphatase	7.67
HSP30	Heat shock Protein, lokalisiert in Plasmamembran	6.30
PHO12	Sezernierte Saure Phosphatase	5.80
YIL057C	Unbekannt	5.70
YOL154W	Protein mit Ähnlichkeit zu Zink Metalloproteinasen	5.24
YPL274W	Hochaffine S-Adenosylmethionin Permease	5.16
CIT3	Mitochondriale Zitratsynthase	5.15
RTA1	Protein, das in den 7-Aminosterol-Wiederstand involviert ist	5.14
YEL070W	Protein mit Ähnlichkeit zu E.coli D-Mannonat Oxidoreductase	5.09
YDL037C	Protein mit Ähnlichkeit zu Glucan 1,4-β-Glukosidase	4.95
YHR136C	Putativer Inhibitor des Pho80-Pho85p Cyclin-abhängigen Kinase Komplexes	4.84
LEE1	Unbekannt	4.59
YMR303C	Alkohol Dehydrogenase II; oxidiert Ethanol zu Acetaldehyde	4.07

Patentansprüche

1. Verfahren zur Generierung eines gentechnisch veränderten Organismus für das Wirksubstanzscreening mit den Schritten
- 5 a) Herbeiführung der heterologen Expression mindestens eines Proteins oder Proteinfragmentes durch gentechnische Veränderung des Organismus
- b) Analyse des veränderten Genexpressionsmusters und Identifizierung kompensatorisch differentiell regulierter Gene
- c) Phänotypisierung des Organismus
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Phänotypisierung durch Minderung/Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Expression oder durch Markierung mindestens eines kompensatorisch differentiell regulierten Gens erfolgt.
- 15 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die gentechnische Veränderung die heterologe Expression mindestens eines dem Organismus eigenen und oder fremdem Proteins oder Proteinfragmentes bewirkt.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die gentechnische Veränderung die Verminderung oder Ausschaltung der Expression mindestens eines dem Organismus eigenen Proteins bewirkt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die veränderte Expression induzierbar ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die gentechnische Veränderung die Einschleusung eines Vektors umfasst, der die

induzierbare Expression des Proteins oder Proteinfragmentes ermöglicht, vorzugsweise eines mit Galactose, Kupfer Tetracyclin oder anderen vergleichbar induzierbaren Vektoren.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die gentechnische Veränderung einen Knock Out, vorzugsweise einen induzierbaren Knock Out umfasst.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus *Drosophila*, *C. elegans*, eine prokaryontische oder eine eukaryontische Zelle ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Hefezelle, vorzugsweise eine Hefezelle vom Stamm *S. cerevisiae* ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der veränderten Genexpression mit Hilfe von DNA- oder Protein-Microarrays erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Phänotypisierung durch Minderung oder Aufhebung der Expression des kompensatorisch differentiell regulierten Gens erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das kompensatorisch differentiell exprimierte Gen gegenüber Kontrollorganismen verstärkt exprimiert wird und die Minderung oder Aufhebung durch zumindest teilweise Inhibierung der verstärkten Expression erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Knock Out des differentiell exprimierten Gens den Austausch mindestens eines Teiles der kodierenden Sequenz des differentiell regulierten Gens gegen die kodierende Sequenz eines Reportergens oder Teile der Reportergensequenz, die ausreichen, detektierbar zu sein, erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das differentiell exprimierte Gen weniger stark exprimiert wird als in Kontrollorganismen und die Minderung oder Aufhebung durch Verstärkung seiner Expression erfolgt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Minderung oder Aufhebung zu einer Wachstumsinhibierung des Organismus führt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Phänotypisierung durch Markierung des Genproduktes des kompensatorisch differentiell regulierten Gens erfolgt.

17. Gentechnisch veränderter, phänotypisierter Organismus, erhalten durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

18. Gentechnisch veränderter Organismus mit

- a) gentechnisch veränderter Expression mindestens eines eigenen oder fremden Gens, die zur kompensatorisch differentiellen Expression mindestens eines anderen, dem Organismus eigenen Gens führt, und
- b) mit durch Minderung/Aufhebung der kompensatorisch differentiellen Expression des Gens oder durch Markierung des kompensatorisch differentiell regulierten Genproduktes herbeigeführten Phänotyp.

19. Verwendung eines gentechnisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 17 oder 18 zum Screening nach Substanzen mit einer Wirkung auf die Funktion des heterologen Proteins oder Proteinfragmentes.

20. Verfahren zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung auf die Funktion des heterolog exprimierten Proteins oder Proteinfragmentes umfassend die Verwendung eines Organismus gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18.

21. Assay zum Wirkstoffscreening mit mindestens einem phänotypisierten Organismus nach einem der Ansprüche 17 oder 18 mit den Schritten

- c) Feststellung des Phänotyps des Organismus
- d) in Kontakt bringen der zu testenden Substanz mit dem Organismus
- e) Beobachten einer möglichen Veränderung des Phänotyps.

22. Substanzen, die durch ein Verfahren nach Anspruch 20 oder einen Assay gemäß Anspruch 21 als den Phänotyp zumindest mindernd identifiziert werden.

Figur 1

